

PENINGKATAN PRODUKSI LIPASE T1.2RQ DI *Pichia pastoris* MELALUI MULTIKOPI GEN LIPASE DAN EKSPRESI BERSAMA *CHAPERONE*

ESTI PUSPITASARI



**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi berjudul “Peningkatan Produksi Lipase T1.2RQ di *Pichia pastoris* Melalui Multikopi Gen Lipase dan Ekspresi Bersama *Chaperone* ” benar merupakan karya saya yang dibuat dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun. Sumber informasi yang dikutip dari karya penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini. Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada IPB University.

Bogor, November 2025

Esti Puspitasari
NIM G3601222009

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

RINGKASAN

PUSPITASARI ESTI. Peningkatan Produksi Lipase T1.2RQ di *Pichia pastoris* Melalui Multikopi Gen Lipase dan Ekspresi Bersama *Chaperone*. Dibimbing oleh ANTONIUS SUWANTO, ARIS TRI WAHYUDI dan RIKA INDRI ASTUTI.

Produksi lipase bakteri secara *heterolog* memiliki beberapa kendala ketika diekspresikan dalam sistem ekspresi protein eukariotik seperti *Pichia pastoris*. Dalam penelitian ini, gen lipase T1.2RQ dari *Geobacillus stearothermophilus* T1.2 diekspresikan pada *P. pastoris* GS115 melalui strategi yang melibatkan multikopi gen lipase, menghasilkan peningkatan aktivitas lipase. Tiga kopi gen lipase dalam plasmid rekombinan pPIC9K_T1.2RQ(3X) diintegrasikan ke dalam genom *P. pastoris* GS115, dan analisis kuantitatif menggunakan teknik qPCR mengkonfirmasi bahwa galur transforman GS115 mengandung enam kopi gen T1.2RQ, menunjukkan dua kali terjadi integrasi. Pengukuran aktivitas lipase menunjukkan bahwa galur GS115/T1.2RQ(6X) mengalami peningkatan 111% dibandingkan dengan yang mengandung 1 kopi gen T1.2RQ. Hasil SDS-PAGE dan Zymogram menunjukkan pita protein dengan ukuran 43kDa. Analisis kualitatif pada media LBA+Trybutyrin dari semua galur yang mengandung gen T1.2RQ menunjukkan zona bening. Produksi lipase dalam fermentasi labu membutuhkan waktu setidaknya 120 jam untuk menghasilkan aktivitas lipase terbaik. Dengan demikian, strategi dengan beberapa salinan gen lipase telah secara signifikan ($P < 0,05$) meningkatkan ekspresi gen lipase bakteri di *P. pastoris* GS115, dan pertama kali dilakukan pada lipase dari *G. stearothermophilus* T1.2.

Gen *hac1*, yang merupakan aktivator transkripsi pada mekanisme respon protein yang tidak diterjemahkan (*Untranslated Protein Response*), diekspresikan bersama dalam *P. pastoris* GS115 untuk meningkatkan produksi lipase dari *G. stearothermophilus*. Plasmid rekombinan pPICZA_{wbe}_hac1 ditransformasi ke dalam *P. pastoris* yang telah memiliki multikopi lipase (1X dan 4X) untuk memperoleh galur khamir transforman GS115 / T1.2RQ (1X) _hac1 dan GS115 / T1.2RQ (4X) _hac1. Galur GS115/T1.2RQ(1X)_hac1 menunjukkan peningkatan aktivitas lipase sebesar 86% setelah 120 jam fermentasi, sedangkan galur GS115/T1.2RQ(4X)_hac1 menunjukkan peningkatan awal yang lebih cepat (38% pada 48 jam fermentasi) dan 28% pada 120 jam. Uji SDS-PAGE dan kualitatif di media LBA+Tributyryl mengkonfirmasi ekspresi lipase ekstraseluler (~43 kDa) sesuai dengan ukuran gen T1.2RQ ~1200 bp. Hasil ini menunjukkan bahwa ekspresi bersama *hac1* secara signifikan (t -test, $p=0,01$) meningkatkan produksi lipase pada *P. pastoris*, terutama pada konstruksi salinan / kopi yang lebih rendah.

Ekspresi gen lipase *G. stearothermophilus* T1.2RQ dalam beberapa salinan (multikopi) telah meningkatkan produksi protein. Strategi multikopi gen dan ekspresi bersama gen *bmh2* dan *sso2* dilakukan untuk meningkatkan sekresi lipase ekstraseluler T1.2RQ pada *P. pastoris*. Transforman GS115 / T1.2RQ (6X), yang berisi enam salinan gen lipase, menunjukkan aktivitas tertinggi, digunakan sebagai cetakan untuk membuat kaset ekspresi *bmh2* dan *sso2*. Gen *bmh2* (797 bp) dan *sso2* (875 bp) dikloning ke dalam vektor pPICZA_{wbe}, dan ditransformasi untuk memperoleh khamir transforman GS115/T1.2RQ(6X)_bmh2 dan

GS115/T1.2RQ(6X)_sso2. Koloni transforman GS115/T1.2RQ(6X)_bmh2#3 menunjukkan peningkatan aktivitas lipase sebesar 71% dibandingkan dengan kontrol GS115/T1.2RQ(6X), sedangkan GS115/T1.2RQ(6X)_sso2#1 menunjukkan penurunan 23%. Berdasarkan data yang diperoleh, diantara dua protein *chaperone* yang diuji, Bmh2 adalah yang paling efektif dalam meningkatkan aktivitas lipase ($P < 0,05$), kemungkinan karena memfasilitasi ekspor protein *heterolog* dari retikulum endoplasma dan pelipatan protein yang benar. Analisis SDS-PAGE menunjukkan pita protein lipase 43 kDa, dan uji kualitatif menggunakan media agar tributyrin mengkonfirmasi aktivitas lipase ekstraseluler pada *P. pastoris* GS115. Pada produksi biodiesel (*Fatty Acid Methyl Ester*/FAME), lipase yang diekspresikan mengkatalisis esterifikasi PFAD (*Palm Fatty Acid Distillated*), mengurangi kandungan asam lemak bebas (FFA) menjadi 4,9%, sehingga memenuhi standar mutu biodiesel (SNI 7182:2015). Analisis gas kromatografi (GC) menunjukkan bahwa kandungan FAME yang dominan adalah metil ester palmitat dan stearat. Penelitian ini menunjukkan bahwa gen *bmh2* adalah protein *chaperone* yang paling efektif secara signifikan ($P < 0,05$) untuk ekspresi bersama gen lipase enam salinan/ kopi, meningkatkan aktivitas lipase ekstraseluler. Enzim yang dihasilkan melalui ekspresi *heterolog* di *P. pastoris* dapat digunakan untuk produksi biodiesel skala laboratorium, sebanding dengan hasil ekspresi *heterolog* pada *E. coli*. Ini pertama kali dilaporkan dari lipase *G. stearothermophilus* T1.2. Hasil penelitian ini berdampak positif pada penelitian ekspresi gen lipase bakteri pada sistem ekspresi eukariot *P. pastoris*.

Kata kunci: *bmh2*, *hac1*, lipase, multikopi, *sso2*

SUMMARY

PUSPITASARI ESTI. Enhanced Production of T1.2RQ Lipase in *Pichia pastoris* Through Multicopy of Lipase Genes and Co-Expression of Chaperone Guided by ANTONIUS SUWANTO, ARIS TRI WAHYUDI and RIKA INDRI ASTUTI.

Bacterial lipase poses potential challenges when expressed in eukaryotic protein expression systems such as *Pichia pastoris*. In this study, the T1.2RQ lipase gene from *Geobacillus stearothermophilus* T1.2 (isolated from Indonesian hot springs) was expressed in *P. pastoris* GS115 through a strategy involving multiple copies of lipase, resulting in increased lipase activity. Three copies of the lipase gene in pPIC9K_T1.2RQ(3X) recombinant plasmid were integrated into the genome of *P. pastoris* GS115, and quantitative analysis using the qPCR technique confirmed that the GS115 transformant contained six copies of the T1.2RQ gene, indicating two integration events. Lipase activity measurement showed that the GS115/T1.2RQ(6X) strain exhibited a 111% increase compared to that containing a copy of the T1.2RQ gene. SDS-PAGE and Zymogram results showed a protein band of 43 kDa. Qualitative analysis in LBA+TBN media of all strains containing the T1.2RQ gene showed clear zones. Lipase production in flask fermentation took at least 120 hours to produce the best lipase activity. Thus, strategies with multiple copies of the gene lipase have significantly increased the expression of the bacterial lipase gene in *P. pastoris* GS115, and it was first performed on lipase from *G. stearothermophilus* T1.2.

The *hac1* gene, a key regulator of the unfolded protein response (UPR), was co-expressed in *P. pastoris* GS115 to enhance the production of a lipase from *G. stearothermophilus*. Multicopy lipase constructs (1X and 4X) were transformed with pICZAwbe_hac1, generating GS115/T1.2RQ(1X)_hac1 and GS115/T1.2RQ(4X)_hac1 strains. The GS115/T1.2RQ(1X)_hac1 strain showed an 86% increase in lipase activity after 120 hours versus the control, while the GS115/T1.2RQ(4X)_hac1 strain showed a faster initial increase (38% at 48 hours) and 28% at 120 hours, which was beneficial for efficient enzyme production. Overexpression of the *hac1* gene enhances lipase production because it activates UPR genes when the endoplasmic reticulum is stressed due to a large number of recombinant proteins and forms proteins that are not appropriately folded. SDS-PAGE and tributyrin plate assays confirmed extracellular lipase expression (~43 kDa). These results demonstrate that *hac1* co-expression significantly (t-test, $p=0.01$) enhances lipase production in *P. pastoris*, especially in lower-copy constructs. The findings are expected to contribute to developing more efficient microbial cell factories for producing industrial enzymes.

The thermostable T1.2RQ lipase from *G. stearothermophilus* was expressed in *P. pastoris* GS115 via a multicopy lipase gene and co-expression of chaperone genes. Co-expression of chaperones *bmh2* (797 bp) and *sso2* (875 bp) was achieved using Gibson Assembly and pPICZAwbe. Transformants GS115/T1.2RQ(6X)_bmh2#3 showed 71% higher activity (t-test, $p=0.017$) versus controls, while *sso2* reduced activity by 23% (t-test, $p=0.028$). SDS-PAGE confirmed a 43 kDa band, and tributyrin assays verified extracellular lipase secretion. In biodiesel trials, the lipase reduced Palm Fatty Acid Distillated Free

Fatty Acid (PFAD FFA) to 4.9%, meeting SNI 7182:2015 standards. This study demonstrates *bmh2*'s role in alleviating Endoplasmic Reticulum (ER) stress and advancing bacterial lipase production in yeast, with applications in sustainable biodiesel. Gas Chromatography (GC) analysis showed methyl palmitate (C16:0) and methyl stearate (C18:0) as the dominant Fatty Acid Methyl Ester (FAME). This research demonstrates that *bmh2* is the most effective chaperone for co-expression with a six-copy lipase, increasing extracellular activity. The enzyme produced by *heterologous* expression in *P. pastoris* can be used for lab-scale biodiesel production, comparable to that expressed in *E. coli*. This is the first report of *G. stearothermophilus* T1.2RQ lipase, and these findings advance bacterial lipase gene expression research in the *P. pastoris* expression system. Future work should optimize tandem chaperone systems (etc, *hac1+bmh2*) and pilot-scale fermentation. This study underscores Indonesia's microbial biodiversity as a resource for novel biocatalysts, aligning with Biodiversitas's mission to bridge ecology and biotechnology.

Keywords: *bmh2*, *hac1*, lipase, multikopi, *sso2*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2025
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

PENINGKATAN PRODUKSI LIPASE T1.2RQ DI *Pichia pastoris* MELALUI MULTIKOPI GEN LIPASE DAN EKSPRESI BERSAMA *CHAPERONE*

ESTI PUSPITASARI

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor pada
Program Studi Mikrobiologi

**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tertutup Disertasi:

1. Prof. Dr. Maggy Thenawidjaja
2. Dr. Dede Abdulrachman

Promotor Luar Komisi Pembimbing pada Sidang Terbuka Disertasi:

1. Prof. Dr. Maggy Thenawidjaja
2. Dr. Dede Abdulrachman



Digitally signed by:
Anja Meryandini

Judul Disertasi: **Peningkatan Produksi Lipase T1.2RQ di *Pichia pastoris* Melalui Multikopi Gen Lipase dan Ekspresi Bersama *Chaperone***

Nama : **Esti Puspitasari**
NIM : **G3601222009**

@Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc.

Pembimbing 2:
Prof. Dr. Aris Tri Wahyudi, M.Si.

Pembimbing 3:
Dr. Rika Indri Astuti, S.Si., M.Si.



Diketahui oleh

Ketua Program Studi Mikrobiologi
Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini, M.S.
NIP. 196203271987032001

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Dr. Berry Juliandi, S.Si., M.Si.
NIP. 197807232007011001



Tanggal Ujian :
20 November 2025

Tanggal Lulus :

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang maha pemurah dan maha penyayang atas segala rahmat, taufik, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul “Peningkatan Produksi Lipase T1.2RQ di *Pichia pastoris* Melalui Multikopi Gen Lipase dan Ekspresi Bersama *Chaperone* “. Disertasi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University.

Proses penyusunan disertasi ini tentunya tidak terlepas dari bantuan, bimbingan, doa, serta dukungan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini, penulis dengan tulus menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih yang mendalam kepada :

1. Prof. Dr. Antonius Suwanto, M.Sc. selaku Ketua Komisi Pembimbing yang telah memberikan arahan, masukan, kesempatan dalam membimbing Penulis.
2. Prof. Dr. Aris Tri Wahyudi, M.Si. selaku Pembimbing ke-2 atas bimbingan, masukan, serta kesabaran dalam membimbing Penulis.
3. Dr. Rika Indri Astuti, S.Si., M.Si. selaku Pembimbing ke-3 atas masukan, dukungan, serta bimbingannya selama ini.
4. Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini, M.S. selaku ketua program studi dan dosen-dosen program studi Mikrobiologi IPB atas masukan dan ilmunya yang penulis dapatkan selama ini.
5. Rekan-rekan sejawat dan sahabat di Laboratorium R&D Bioteknologi PT Wilmar Benih Indonesia yang telah membantu baik dalam diskusi ilmiah maupun teknis.
6. Suami dan Putri tercinta serta keluarga atas doa, kasih sayang, dan dukungan tiada henti.
7. Do’a yang tulus untuk Almarhum dan Almarhumah kedua orang tua dan mertua yang telah membesarkan, menyayangi dan mendidik penulis sehingga ada pada titik ini.

Penulis menyadari bahwa disertasi ini masih jauh untuk dikatakan sempurna, dengan demikian kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi penyempurnaan karya ilmiah ini. Akhir kata, semoga disertasi ini dapat memberikan manfaat, baik secara akademik maupun praktis, khususnya dalam bidang Mikrobiologi.

Bekasi, November 2025

Esti Puspitasari

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
1.5 Ruang Lingkup	3
1.6 Kebaruan (<i>novelty</i>)	3
1.7 Hipotesis	4
II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Lipase	5
2.2 Sumber Lipase	5
2.3 Sistem Ekspresi Prokariot	6
2.4 Sistem Ekspresi Eukariot	6
2.5 Sekresi Protein di <i>Pichia pastoris</i> .	8
2.6 Jalur <i>Untranslated Protein Response (UPR)</i>	10
2.7 Biodiesel (<i>Fatty Acid Methyl Ester</i>)	11
III METODE	14
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	14
3.2 Alat dan Bahan	14
3.3 Prosedur Kerja	14
3.3.1 Konstruksi Multikopi Gen Lipase T1.2RQ di Genom <i>Pichia pastoris</i>	14
3.3.2 Modifikasi Vektor	18
3.3.3 Penentuan Jumlah Salinan Gen	19
3.3.4 Konstruksi Plasmid Rekombinan T1.2RQ Lipase dengan <i>Chaperone</i>	20
3.3.5 Transformasi ke <i>Escherichia coli</i> dan <i>Pichia pastoris</i>	22
3.3.6 Produksi Enzim Menggunakan Rekombinan <i>Pichia pastoris</i>	23
3.3.7 Uji Lipolitik	24
3.3.8 Pengukuran Kadar Protein, Analisis <i>SDS-PAGE</i> dan Zimogram	24
3.3.9 Produksi Biodiesel dan Analisis <i>Free Fatty Acid (FFA)</i>	25
3.3.10 Analisis <i>FAME</i> dengan Gas Kromatografi (GC)	25
3.4 Analisis Data	26
IV HASIL	28
4.1 Multikopi Gen Lipase T1.2RQ	28
4.1.1 Konstruksi Plasmid Rekombinan Multikopi Gen Lipase	28

4.1.2	Penentuan Nomor Salinan Gen	31
4.1.3	Produksi Enzim T1.2RQ Lipase	32
4.2	Ekspresi Multikopi Gen Lipase T1.2RQ Bersama dengan <i>hac1</i>	33
4.2.1	Konstruksi Plasmid Rekombinan Gen Lipase T.2RQ dengan <i>hac1</i>	33
4.2.2	Hasil Uji Lipolitik Transforman GS115/T1.2RQ(nX)_ <i>hac1</i>	36
4.2.3	Hasil Analisis Protein Transforman GS115/T1.2RQ(nX)_ <i>hac1</i>	37
4.3	Ekspresi Multikopi Gen Lipase T1.2RQ Bersama dengan <i>bmh2</i> dan <i>sso2</i>	37
4.3.1	Konstruksi Plasmid Rekombinan Gen Lipase T1.2RQ dengan <i>bmh2</i> dan <i>sso2</i>	37
4.3.2	Hasil Uji Lipolitik Transforman GS115/T1.2RQ (6X)_ <i>bmh2</i> dan GS115/ T1.2RQ (6X)_ <i>sso2</i>	40
4.3.3	Hasil Analisis Protein Transforman GS115/(T1.2RQ(6X)_ <i>bmh2</i> dan GS115/ T1.2RQ (6X)_ <i>sso2</i>	40
4.4	Aplikasi Lipase T1.2RQ untuk Produksi Biodiesel	41
V	PEMBAHASAN	44
5.1	Multikopi Gen Lipase T1.2RQ	44
5.2	Ekspresi Multikopi Gen Lipase T1.2RQ Bersama dengan <i>hac1</i>	47
5.3	Ekspresi Multikopi Gen Lipase T1.2RQ Bersama dengan <i>bmh2</i> dan <i>sso2</i>	49
5.4	Aplikasi Lipase T1.2RQ untuk Produksi Biodiesel	52
VI	SIMPULAN DAN SARAN	54
6.1	Simpulan	54
6.2	Saran	54
	DAFTAR PUSTAKA	55
	LAMPIRAN	64
	RIWAYAT HIDUP	72

DAFTAR TABEL

3. 1	Daftar gen dan plasmid yang digunakan pada penelitian ini	15
3. 2	Komposisi gel <i>SDS-PAGE</i> (modifikasi Laemmli 1970)	25
4. 1	Jumlah salinan gen T1.2RQ	32
4. 2	Produksi biodiesel	41
4. 3	Komposisi FAME	42

DAFTAR GAMBAR

1. 1	Diagram alir dan kerangka penelitian	4
2. 1	Pendekatan-pendekatan untuk meningkatkan sekresi protein di <i>P. pastoris</i>	9
2. 2	Reaksi kimia esterifikasi dan transesterifikasi	12
2. 3	Reaksi kimia yang dikatalisis oleh enzim lipase	13
3. 1	Skematik konstruksi pPIC9K_T1.2RQ.(1X)	16
3. 2	Skematik konstruksi pPIC9K_T1.2RQ.(2X)–(4X)	17
3. 3	Skematik konstruksi multikopi pPIC9K_T1.2RQ.(nX)	18
3. 4	Modifikasi vektor ekspresi	19
3. 5	Peta skematik penggabungan ampikon gen <i>bmh2</i> upstream dan downstream dengan Gibson Assembly	21
3. 6	Peta skematik penggabungan ampikon gen <i>sso2</i> upstream dan downstream dengan Gibson Assembly	21
3. 7	Skematik konstruksi GS115/T1.2RQ(6x)- <i>bmh2</i> dan GS115/T1.2RQ (6X)- <i>sso2</i>	22
4. 1	Hasil penskuenan gen lipase T1.2RQ.	28
4. 2	Peta plasmid rekombinan dan hasil elektroforesis	29
4. 3	Peta plasmid rekombinan multikopi lipase T1.2RQ	30
4. 4	Verifikasi transforman multikopi T1.2RQ	31
4. 5	Transforman GS115/pPIC9K_T1.2RQ(n).	33
4. 6	Modifikasi Vektor pPICZαA menjadi pPICZAwbe	34
4. 7	Transforman dengan gen <i>chaperone hac1</i>	35
4. 8	Peta plasmid rekombinan pPICZAwbe-hac1 (4.522 bp)	36
4. 9	Modifikasi Vektor pPICZαA	36
4. 10	Analisis protein Hac1	37
4. 11	Transforman <i>P. pastoris</i> GS115/ T1.2RQ (6X)- <i>bmh2</i>	38
4. 12	Transforman <i>P. pastoris</i> GS115/ T1.2RQ(6X)_- <i>sso2</i>	39
4. 13	Efek protein <i>chaperone</i> pada produksi lipase T1.2RQ selama fermentasi 120 jam pada galur GS115/T1.2RQ (6X)	40
4. 14	Analisis protein galur rekombinan <i>Pichia pastoris</i> GS115/T1.2RQ (6X) dengan <i>chaperone</i>	41
4. 15	Kromatogram FAME yang diproduksi dari PFAD dengan T1.2RQ sistem ekspresi <i>E.coli</i> sebagai katalis	42
4. 16	Kromatogram FAME yang diproduksi dari PFAD dengan T1.2RQ sistem ekspresi <i>P. pastoris</i> sebagai katalis	43
4. 17	Kromatogram FAME yang diproduksi dari PFAD tanpa katalis enzim	43

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR LAMPIRAN

1	Primer	65
2	Sekuen dari Primer	65
3	Peta plasmid pMGT1.2RQ	66
4	<i>Overlapping Extension PCR</i> (Bryksin dan Matsumura 2010)	66
5	Hasil Pensekueanan DNA gen <i>bmh2</i>	67
6	Hasil Pensekueanan DNA Gen <i>sso2</i>	67
7	Hasil Pensekueanan DNA Gen <i>hac1</i>	68
8	Hasil Pensekueanan DNA Gen GAPDH	68
9	Integrasi plasmid rekombinan ke dalam genom <i>Pichia pastoris</i>	69
10	<i>Untranslated Protein Response</i> (UPR) di yeast (Guerfal <i>et al.</i> 2010)	69
11	Peta skematik pPICZ α A tanpa sekuen signal α -factor (3.345 bp)	70
12	Skema fungsi protein14-3-3 dari yeast (Obsilova dan Obsil 2024)	70

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.